

METHOD FOR OBTAINING A POWDER CONTAINING VIABLE MICROORGANISMS, POWDER OBTAINED ACCORDING TO THIS METHOD AND DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

Publication number: WO0144440

Publication date: 2001-06-21

Inventor: SCHUCK PIERRE (FR); BOYAVAL PATRICK LUCIEN GAS (FR)

Applicant: AGRONOMIQUE INST NAT RECH (FR); SCHUCK PIERRE (FR); BOYAVAL PATRICK LUCIEN GAS (FR)

Classification:


- **international:** **C12N1/04; C12N1/04;** (IPC1-7): C12N1/04

- **European:** C12N1/04






Application number: WO2000FR03492 20001212

Priority number(s): FR19990015688 19991213

Also published as:

 FR2802212 (A1)

Cited documents:

 FR2290846
 EP0818529
 EP0906951
 WO9810666
 US4423079
more >>

Report a data error here

Abstract of WO0144440

The invention relates to a method for producing a powder which contains viable microorganisms and which has a long storage life, by atomization. The invention also relates to a dry powder which contains viable microorganisms, which has a long storage life and which is produced according to the inventive method. Finally, the invention relates to a device for producing a powder which contains viable microorganisms and which has a long storage life, by atomization.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 juin 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/44440 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 1/04

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03492

(22) Date de dépôt international:
12 décembre 2000 (12.12.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/15688 13 décembre 1999 (13.12.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)** [FR/FR]; 147 rue de l'Uni-
versité, F-75341 Paris cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **SCHUCK,**
Pierre [FR/FR]; 6 allée de Savoie, F-35131 Chartres
de Bretagne (FR). **BOYVAL, Patrick, Lucien, Gas**
[FR/FR]; Les Ruisselées, F-35520 la Meziere (FR).

(74) Mandataires: **CATHERINE, Alain** etc.; Cabinet Harle &
Phelip, 7 rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A POWDER CONTAINING VIABLE MICROORGANISMS, POWDER OBTAINED
ACCORDING TO THIS METHOD AND DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Titre: PROCEDE POUR L'OBTENTION D'UNE POUDRE CONTENANT DES MICRO-ORGANISMES VIABLES,
POUDRE OBTENUE SELON CE PROCEDE ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a powder which contains viable microorganisms and which has a long storage life, by atomization. The invention also relates to a dry powder which contains viable microorganisms, which has a long storage life and which is produced according to the inventive method. Finally, the invention relates to a device for producing a powder which contains viable microorganisms and which has a long storage life, by atomization.

(57) Abrégé: L'invention concerne en premier lieu un procédé pour la préparation par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue. L'invention a encore pour objet une poudre sèche contenant des micro-organismes viables et à longue durée de conservation, susceptible d'être obtenue par le procédé de l'invention. La présente invention est également relative à un dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue.



WO 01/44440 A1

Procédé pour l'obtention d'une poudre contenant des micro-organismes viables, poudre obtenue selon ce procédé et dispositif pour sa mise en oeuvre.

L'invention concerne en premier lieu un procédé pour la préparation par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue.

L'invention a encore pour objet une poudre sèche contenant des
5 micro-organismes viables et à longue durée de conservation, susceptible d'être obtenue par le procédé de l'invention.

La présente invention est également relative à un dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue.

10 De nombreux secteurs de l'industrie ont recours depuis longtemps à l'utilisation de micro-organismes, du fait de la capacité des micro-organismes à produire des enzymes catalysant la synthèse de produits d'intérêt ou encore de leur capacité à produire directement des métabolites d'intérêt industriel.

15 Par exemple, les industries agro-alimentaires utilisent classiquement des micro-organismes dans des procédés de biotransformation des produits de l'agriculture, tels que par exemple l'industrie laitière ou fromagère, l'industrie de la charcuterie, les industries productrices de biomasse (par exemple la fabrication de levain).

20 De nombreux types de micro-organismes sont également utilisés dans des procédés de synthèse de produits organiques, tels que des alcools, divers solvants ou des acides organiques.

L'industrie pharmaceutique utilise également de manière croissante des micro-organismes, le cas échéant des micro-organismes recombinés,
25 afin de produire des molécules d'intérêt thérapeutique, telles que des vitamines, des vaccins, des cytokines ou des hormones.

Il existe ainsi dans l'industrie un besoin de disposer d'une matière première contenant des micro-organismes viables, facilement transportable, dont les conditions de conservation sont simples, possédant une forte
30 densité en micro-organismes viables et pouvant en outre être conservée longtemps sans diminution significative du nombre de micro-organismes de départ.

Il est de plus hautement désirable que la matière première contenant les micro-organismes soit d'un volume le plus réduit possible afin
35 de limiter les frais de stockage et de transport.

Classiquement, la préparation d'une biomasse implique une multiplication des micro-organismes dans des fermenteurs selon un procédé continu ou discontinu, puis une séparation et une concentration des micro-organismes par centrifugation (séparation par différence de densité), ou encore par ultrafiltration ou microfiltration sur membrane, par exemple par des membranes ayant des seuils de coupure compris entre 300.000 et 500.000 Daltons (Lejard et al., 1994 in Bactéries lactiques, page 539, vol.I., LORICA).

La centrifugation et les techniques séparatives à membranes conduisent à un accroissement de la densité cellulaire de 10 à 50 fois (Branger et al., 1994 in Bactéries lactiques p.p.523-537, vol.1, LORICA).

Les ferments concentrés ainsi obtenus sont commercialisés, soit en l'état, soit sous forme congelée après addition le plus souvent de cryoprotecteurs tels que le saccharose, le tréhalose, des petits peptides, du glutamate, de l'ascorbate ou encore des sels de magnésium.

Toutefois, la conservation des micro-organismes sous forme congelée requiert un strict respect de la chaîne du froid.

Classiquement, la congélation se fait par l'emploi d'azote liquide et le stockage ainsi que le transport exigent le maintien d'une température inférieure à - 60°C.

La conservation des micro-organismes concentrés sous forme de matière première congelée est complexe et onéreuse du fait de la nécessité de maintenir cette matière première à température basse.

Après concentration, la matière première contenant des micro-organismes peut également être conservée à une température voisine de 3°C à 4°C après lyophilisation. Toutefois, le coût de l'étape de lyophilisation est élevé et le prix de revient de la matière première lyophilisée est peu compatible avec les contraintes de l'industrie.

Une autre approche consiste en la déshydratation d'un milieu à forte densité en micro-organismes, l'étape de déshydratation pouvant être réalisée sur un lit fluidisé ou encore par atomisation.

La déshydratation des levains en tour d'atomisation est une technique qui a été largement employée dans l'industrie laitière (Bullock L. et J.W. Lightbrown, 1947 Quart. J. Pharm. Pharmac., 20:312.

L'article de Peri et al. (Peri C. et C. Pompei, 1976, Riv. Sci. Tecn. Alim. Nutr. UM. , pages 231-236) décrit un procédé d'obtention d'une poudre contenant des bactéries lactiques obtenues par déshydratation dans une tour d'atomisation. Selon cet article, un taux de survie des bactéries
5 lactiques contenues dans une poudre de yoghourt déshydratée par atomisation est faible, et au maximum de l'ordre de 50% des micro-organismes viables de départ après 120 jours de conservation à une humidité relative de 23%.

L'article de Brajapati et al. (Brajapati J.B. et al., 1987, Australian
10 Journal of Dairy Technology, March/June: pages 17-21) est une étude concernant le taux de survie de bactéries du type *Lactobacillus acidophilus* contenues dans une poudre déshydratée par atomisation à base de lait fermenté en présence de banane, de jus de tomate et de sucre. Dans ce cas, il est observé un taux de survie maximal des micro-organismes
15 d'environ 66% après conservation pendant deux mois dans des sacs de polyéthylène étanches à une température comprise entre 28 et 31°C et à un taux d'humidité de 4,82%.

L'article de Abd el Gawad et al. (1989, Egyptian J. Dairy , sci., vol.17:273-281) étudie l'effet des conditions de culture des micro-organismes
20 préalables à la déshydratation par atomisation. Cet article décrit des taux de survie des micro-organismes dans le produit directement obtenu à l'issue de l'étape de déshydratation par atomisation, respectivement de 30% pour *S. lactis*, 76% pour *S. thermophilus* et 31% pour *L. bulgaricus*. En outre, des taux de survie de ces différents micro-organismes après 30 jours de
25 conservation dans des sacs de polyéthylène étanches étaient réduits respectivement à 3,6% , 7% et 1,18% lorsque la température de conservation est comprise entre 20 et 25°C.

L'article de Espina (Espina F and V.S. Packard, 1979, Journal of Food Protection, vol.42 (2):149-152), relatif à l'obtention de poudres de lait
30 écrémé contenant des bactéries lactiques déshydratées par atomisation, précise que le taux de survie des micro-organismes directement issus de l'étape de déshydratation par atomisation est d'au maximum 10% des micro-organismes viables avant déshydratation. D'autre part, une réduction supplémentaire de 50% du taux de survie est observée après conservation

de la poudre obtenue selon le procédé décrit dans cet article dans des sacs de polyéthylène étanches pendant 30 jours à la température de 4°C.

L'article de Miller et al. (Miller D.L. et al., 1972, Journal of Food Science, vol.37: 828-831) concerne une étude du taux de survie des bactéries du genre *Salmonella* et *Escherichia coli* après déshydratation d'un concentré de lait par atomisation. Les résultats décrits dans cet article indiquent une réduction du nombre de micro-organismes viables allant de 100 fois à 1000 fois pour les bactéries du genre *Salmonella* et *Escherichia coli*.

Les procédés de déshydratation par atomisation décrits dans les articles ci-dessus sont réalisés classiquement par atomisation d'un milieu liquide concentré en micro-organismes en présence d'un courant d'air chaud au sommet d'une tour d'atomisation, le produit atomisé et déshydraté étant recueilli à la base de la tour d'atomisation.

Un tel procédé est aussi décrit dans la demande PCT N°WO 98/10 665 au nom de la Société des Produits Nestlé S.A. Selon le procédé de déshydratation décrit dans cette demande, la température d'entrée de l'air chaud est d'environ 300°C, la température de sortie de l'air chaud est d'environ 65°C et le pourcentage d'humidité de la poudre obtenue après déshydratation est compris entre 3,5 et 4%. A l'issue de l'étape de déshydratation, il est observé un taux de survie des bactéries lactiques d'environ 6%. La poudre obtenue après atomisation est récupérée directement sur un fluidiseur et chauffée à des températures allant de 60 à 90°C afin de compléter la déshydratation.

Il résulte des études décrites ci-dessus que les procédés de déshydratation d'un milieu concentré en micro-organismes de l'état de la technique conduisaient à une forte mortalité des micro-organismes au cours de l'étape de déshydratation elle-même, les poudres obtenues selon les procédés de l'état de la technique ne présentant pas un maintien durable de la viabilité des micro-organismes du matériau déshydraté, même dans des conditions de conservation à basse température.

Le demandeur s'est attaché à mettre au point un nouveau procédé de déshydratation d'un milieu liquide contenant des micro-organismes dans le but d'obtenir une poudre possédant un taux de survie maximal des micro-organismes initialement présents dans le milieu liquide, ladite poudre étant

en outre susceptible d'être conservée durablement sans réduction importante du nombre de micro-organismes viables et sans altération physiologique de ces micro-organismes.

Il a été montré selon l'invention qu'un taux de survie accru des
5 micro-organismes à l'issue de l'étape d'atomisation pouvait être obtenu en diminuant la température d'entrée du gaz chaud, par rapport aux procédés de l'état de la technique.

Par gaz chaud, au sens de l'invention, on entend de préférence de l'air ou de l'azote. L'azote est préférentiellement utilisé pour la production
10 d'une poudre contenant des micro-organismes anaérobies ou encore lorsqu'une oxydation moindre des composants du milieu liquide contenant les micro-organismes est recherchée.

Toutefois, le demandeur a également observé que la diminution de la température d'entrée du gaz chaud, du fait d'un moindre transfert
15 d'énergie entre le courant de gaz chaud et les gouttelettes atomisées de milieu liquide contenant les micro-organismes, conduisait à une déshydratation incomplète et à l'obtention d'une pâte humide, et non d'une poudre.

Cette pâte ne peut pas être travaillée facilement et n'est pas non
20 plus susceptible d'être ultérieurement fluidisée sous forme de poudre. Il en résulterait un conditionnement et un transport difficiles.

En outre, si le taux de survie des micro-organismes initialement contenu dans le milieu liquide concentré est important, le taux d'humidité de la pâte, qui se situe aux alentours de 5 à 15%, est néfaste à la conservation
25 à long terme des micro-organismes, même à une température de 4°C.

Afin de résoudre ce problème technique, le demandeur a mis au point un procédé dans lequel la pâte friable obtenue à l'issue de l'étape d'atomisation est recueillie sur un organe de séchage avant tout traitement ultérieur.

30 L'étape de séchage permet d'abaisser le pourcentage d'humidité du produit directement issu de l'étape d'atomisation et rend alors possible la fabrication d'une poudre sèche contenant des micro-organismes viables susceptibles d'être conservés à long terme.

Un premier objet de l'invention consiste donc en un procédé pour
35 l'obtention d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée

de conservation longue, par atomisation d'un milieu liquide contenant les micro-organismes, caractérisé en ce que l'étape d'atomisation est réalisée dans des conditions permettant d'obtenir un produit atomisé dont le taux d'humidité est compris entre 5% et 15%, préférentiellement entre 7% et 10% environ et est suivie d'une étape de séchage du produit atomisé.

L'étape d'atomisation du milieu liquide contenant les micro-organismes viables est de préférence réalisée à co-courant dans un gaz chaud (air ou gaz neutre tel que l'azote) sous pression.

Préférentiellement, le milieu liquide contenant les micro-organismes comprend entre environ 10^7 et 10^{12} et encore plus préférentiellement de 10^9 à 10^{11} cellules viables de micro-organismes par millilitre.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, le milieu liquide contenant des micro-organismes est constitué d'un aliment lacté contenant une des bactéries viables à effet probiotique, ledit aliment correspondant à des besoins nutritionnels spécifiques de la population (enfants ou personnes âgées). A titre d'exemple non limitatif, les bactéries à effet probiotique additionnées à des formulations lactées avant séchage selon la présente invention peuvent être du genre *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*.

De manière préférée, le milieu liquide contenant les micro-organismes viables et le gaz chaud sont apportés au sommet de la tour d'atomisation.

Selon un aspect avantageux du procédé selon l'invention, la température du gaz à l'entrée de la tour d'atomisation est comprise entre 100°C et 180°C, et préférentiellement entre 120°C et 140°C.

Selon un autre aspect avantageux du procédé selon l'invention, la température du gaz à la sortie de la tour d'atomisation est comprise entre 30°C et 80°C, et préférentiellement entre 40°C et 60°C.

Selon encore un autre aspect, le débit de gaz chaud à l'entrée de la tour d'atomisation est compris entre 3500 et 6000m³/h, et est préférentiellement d'environ 5000m³/h.

La pression d'entrée du milieu liquide contenant les micro-organismes au sommet de la tour d'atomisation est préférentiellement comprise entre 8 et 18MPa, et de préférence entre 10 et 12MPa.

De manière tout à fait préférée, l'étape d'atomisation du milieu liquide contenant les micro-organismes conduit à la formation d'une pâte friable, qui est recueillie sur un organe de séchage .

Selon une première alternative, le séchage du produit atomisé dans
5 l'organe de séchage est réalisé sans chauffage.

Selon une seconde alternative, le séchage du produit atomisé est réalisé avec chauffage. Il s'agit de préférence d'un chauffage modéré opéré plus particulièrement lorsque le milieu liquide contenant les micro-organismes contient des composants hygroscopiques.

10 Comme déjà indiqué précédemment, l'étape de séchage est réalisée en aval de la sortie de la tour d'atomisation, c'est-à-dire à une température significativement inférieure à la température de sortie du gaz chaud de la tour d'atomisation.

Par exemple, il a été observé que lorsque le procédé est mis en
15 oeuvre avec de l'air et à une température d'entrée de l'air chaud de la tour d'atomisation de 180°C, la température de l'air directement en contact avec la pâte friable au niveau de l'organe de séchage est abaissée à sa température humide de 45°C \pm 2°C, c'est-à-dire à une température à laquelle la mortalité des micro-organismes est très réduite.

20 Préférentiellement, la température du gaz lors de l'étape de séchage est inférieure d'au moins 25°C, préférentiellement d'au moins 30°C à la température de l'air à la sortie de la tour d'atomisation observée selon les procédés de l'état de la technique.

Avantageusement, l'étape de séchage est réalisée à l'aide d'un
25 organe de séchage tel qu'un disque rotatif ou un tapis roulant.

De préférence, la durée de l'étape de séchage du produit atomisé est comprise entre 5 et 30 minutes, préférentiellement entre 10 et 20 minutes.

30 Comme déjà indiqué, les caractéristiques originales du procédé pour l'obtention par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables selon l'invention, permettent désormais à l'homme du métier de préparer une matière première riche en micro-organismes, facilement transportable, et qui peut être conservée à long terme et à température ambiante sans diminution importante du nombre de micro-

organismes viables retrouvés dans cette matière première directement à l'issue du procédé.

Les caractéristiques avantageuses de la poudre obtenue par la mise en oeuvre du procédé ci-dessus résultent de ce qu'une déshydratation
5 seulement partielle du milieu liquide concentré en micro-organismes est réalisée lors de l'étape d'atomisation, réduisant ainsi notablement la mortalité des micro-organismes par rapport aux procédés de l'état de la technique dans lesquels est recherchée une déshydratation poussée du milieu liquide contenant les micro-organismes lors de l'atomisation.

10 En outre, l'étape de séchage à une température peu élevée et inférieure à la température de sortie de l'air chaud n'affecte pas sensiblement la viabilité des micro-organismes présents initialement dans la pâte friable recueillie sur l'organe de séchage, tout en permettant une déshydratation plus complète du produit atomisé qui passe alors de l'état de
15 pâte friable à l'état de poudre ayant un taux d'humidité faible.

Comme indiqué ci-dessus, le taux d'humidité du produit atomisé à l'issue de l'étape d'atomisation est compris entre 5% et 15%, préférentiellement entre 7% et 10%.

De plus, le taux d'humidité de la poudre obtenue à l'issue de l'étape
20 de séchage est compris entre 6% et 9%.

Le faible taux d'humidité de la poudre à l'issue de l'étape de séchage est particulièrement avantageux, car il permet des traitements ultérieurs de la poudre sans atteinte notable à la viabilité des micro-organismes.

25 De préférence, la poudre obtenue à l'issue de l'étape de séchage est ensuite fluidisée et subit une déshydratation finale par chauffage, une telle déshydratation ultérieure par chauffage de la poudre préalablement séchée n'affectant pas sensiblement la viabilité des micro-organismes du fait du bas taux d'humidité initial de la poudre au début de l'étape de fluidisation
30 et de la meilleure résistance au stress thermique des micro-organismes partiellement déshydratés.

Préférentiellement, la fluidisation est réalisée sur un vibro-fluidiseur comportant un moyen de chauffage.

Selon le procédé, la poudre fluidisée peut subir une étape de
35 broyage.

Selon un mode particulièrement avantageux de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, le milieu liquide contenant les micro-organismes viables comprend une forte proportion de lactose, préférentiellement environ 15 à 30% de lactose en poids total du milieu liquide.

5 Le lactose, contenu en fortes proportions dans le lait, est bien connu pour ses propriétés hygroscopiques et est en conséquence difficile à sécher, sauf dans le cas où le lactose peut être obtenu sous forme cristallisée, auquel cas ses propriétés hygroscopiques sont fortement diminuées.

10 Il a été observé selon l'invention que, lorsque le milieu liquide contenant les micro-organismes viables comprend une forte proportion de lactose, l'étape de séchage subséquente à l'étape d'atomisation permet la cristallisation du lactose et réduit ainsi fortement les propriétés hygroscopiques de la poudre obtenue à l'issue de l'étape de séchage, ce qui
15 a pour effet de faciliter les traitements ultérieurs de fluidisation et de déshydratation poussée, d'une part, et d'autre part, d'en faciliter la conservation à long terme.

Selon un aspect avantageux du procédé selon l'invention, celui-ci est en outre caractérisé en ce que le milieu liquide contenant les micro-
20 organismes viables comprend entre 15% et 30% de lactose, en poids total du produit liquide.

D'autres sucres cristallisables peuvent également être employés dans les mêmes proportions que le lactose, tels que le saccharose, le dextrose ou encore les malto-dextrines.

25 Dans un tel mode de réalisation, le procédé est en outre caractérisé en ce que l'étape de séchage du produit atomisé est accompagnée d'une cristallisation du sucre cristallisable contenu dans ce dernier.

Les micro-organismes utilisés dans le procédé de l'invention peuvent être de toute nature.

30 Il peut s'agir notamment indifféremment de bactéries ou de levures.

Les bactéries peuvent être par exemple des bactéries lactiques, telles que les souches de bactéries lactiques décrites dans la demande PCT N°WO 98/10.666, dont le passage pertinent est ici incorporé par référence.

Il peut s'agir aussi de bactéries propioniques.

Il peut également s'agir de bactéries dont la multiplication est recherchée pour la production d'antigènes pour des vaccins, pour la production d'enzymes catalysant la biotransformation de composés d'intérêt industriel, ou encore pour la production directe de métabolites utilisés dans l'industrie.

Il peut s'agir également de micro-organismes transformés par génie génétique et capables d'exprimer des protéines recombinantes, tels que des enzymes, ou encore des métabolites d'intérêt industriel, par exemple d'intérêt thérapeutique, tels que des vitamines, des antigènes, des cytokines ou des hormones.

Parmi les levures susceptibles d'être traitées par le procédé selon l'invention, on peut citer les levures utilisées dans l'industrie boulangère, telles que les souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Il peut s'agir également de cellules d'algues unicellulaires produisant des métabolites conférant une résistance au stress osmotique ou thermique, telle que la glycine-bétaïne, et qui peuvent être incorporées dans des produits pour l'alimentation animale ou humaine ou utilisées directement comme suppléments nutritifs. Il peut s'agir notamment de cellules d'algues unicellulaires telles que *Spirulina scenedesmus*, *Chlorella diatomae* ou encore *Dunaliella*.

Du fait notamment de la faible mortalité des micro-organismes observés au cours de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, il est désormais possible d'obtenir une poudre sèche contenant des micro-organismes à haute densité cellulaire, plus particulièrement une poudre sèche contenant de 10^7 à 10^{12} micro-organismes viables par gramme de matière sèche, telle que mesurée selon la méthode par dessiccation à l'étuve (102°C - 105°C) jusqu'à masse constante.

Il a de plus été montré selon l'invention que la poudre sèche obtenue selon le procédé ci-dessus pouvait être conservée plus de six mois sans que la viabilité des micro-organismes soit notablement affectée.

Ainsi, il a été observé selon l'invention que 82% des micro-organismes retrouvés dans la poudre sèche à l'issue du procédé ci-dessus étaient encore présents après une conservation de la poudre sèche pendant six mois à la température de 7°C dans des sacs d'aluminium.

De plus, les micro-organismes viables contenus dans la poudre sèche obtenue par le procédé de l'invention n'ont pas subi d'altération de leur capacité physiologique, comme en témoigne le fait qu'aucun allongement significatif du temps de multiplication n'a été observé après
5 stockage.

Un autre objet de l'invention consiste en une poudre sèche contenant de 10^7 à 10^{12} micro-organismes viables par gramme de matière sèche, de préférence contenant de 10^9 à 10^{11} micro-organismes viables par gramme de matière sèche.

10 La poudre sèche ci-dessus est en outre caractérisée en ce qu'elle possède un taux d'humidité compris entre 3% et 7%, tel que mesuré par dessiccation à l'étuve jusqu'à masse constante.

Le nombre de micro-organismes viables retrouvé dans la poudre sèche obtenue selon l'invention, à l'issue d'une conservation à l'abri de l'air pendant six mois à une température comprise entre 7 et 17°C est d'au moins
15 70%, préférentiellement d'au moins 80% du nombre de micro-organismes de départ.

La poudre sèche selon l'invention se caractérise aussi en ce qu'elle comprend de 60% à 70% de sucre sous forme cristallisée.

20 La poudre sèche selon l'invention est en outre caractérisée en ce qu'elle présente une solubilité dans l'eau distillée supérieure à 99%, préférentiellement supérieure à 99,5%.

Selon encore un autre aspect, la poudre sèche possède un indice de dispersibilité supérieure à 90%, préférentiellement d'au moins 95%.

25 Selon une caractéristique avantageuse, la poudre sèche a un temps de mouillabilité d'au plus 10 secondes, préférentiellement d'au plus 7 secondes.

30 Selon une autre caractéristique avantageuse, la taille des particules de la poudre sèche selon l'invention est comprise entre 1µm et 40µm environ.

L'invention a également trait à une composition destinée à l'ensemencement d'un produit en vue de la multiplication de micro-organismes caractérisée en ce qu'elle comprend une poudre sèche telle que décrite ci-dessus, ou est constituée de la poudre sèche.

35 L'invention concerne aussi un produit pour l'alimentation humaine ou animale, caractérisé en ce qu'il estensemencé avec une composition ou une poudre sèche ci-dessus.

L'invention est aussi relative à un produit destiné à l'alimentation humaine ou animale, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une poudre sèche telle que décrite ci-dessus.

Un tel produit pour l'alimentation humaine ou animale peut être un
5 lait fermenté, un levain ou une boisson fermentée.

Il peut s'agir par exemple d'un yoghourt séché ou d'un lait fermenté séché.

Il peut encore s'agir d'un produit lacté destiné à l'alimentation des nourrissons, des bébés ou des jeunes enfants, auquel cas la poudre sèche
10 obtenue selon le procédé décrit ci-dessus comprend de 10^4 à 10^{12} micro-organismes viables, de préférence des micro-organismes à activité probiotique, par gramme de matière sèche. Une telle poudre obtenue selon le procédé de l'invention se caractérise aussi par le faible nombre de micro-organismes non viables par gramme de matière sèche, ce qui n'est pas le
15 cas des poudres sèches fabriquées selon les procédés de l'état de la technique comme cela résulte des résultats présentés dans les exemples.

Le demandeur a également mis au point un dispositif comprenant un moyen de séchage approprié, adapté à la réalisation du procédé ci-dessus.

20 Un autre objet de l'invention consiste en un dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue, comprenant une tour d'atomisation, caractérisé en ce que ledit dispositif comprend un organe de séchage placé en aval de la tour d'atomisation.

25 La figure unique représente à titre illustratif et nullement limitatif le schéma d'un dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables conforme à l'invention.

Préférentiellement, l'organe de séchage (11) est placé directement à la base de la tour d'atomisation (7). Ainsi, les gouttelettes du milieu liquide
30 contenant les micro-organismes, produites par atomisation et partiellement déshydratées par transfert d'eau de la gouttelette vers le courant de gaz chaud durant leur séjour dans la tour (7) d'atomisation, sont directement recueillies à la base de la tour (7) sur l'organe de séchage (11).

De manière préférée, l'organe de séchage est dépourvu de tout
35 moyen de chauffage. Le séchage est opéré par simple contact de la pâte

friable recueillie sur l'organe de séchage (11) avec l'air circulant directement en aval de la base de la tour d'atomisation (7) dont la température est inférieure à la température de sortie du gaz chaud de la tour d'atomisation.

Toutefois, il peut être prévu un moyen de chauffage, notamment lorsque le milieu liquide contenant les micro-organismes contient des constituants hygroscopiques et que l'étape de séchage doit être poussée. Un tel moyen de chauffage peut être un moyen de circulation de gaz chaud similaire au moyen de chauffage (14) utilisé pour le moyen de fluidisation (15).

Selon un premier aspect, l'organe de séchage (11) est constitué d'un disque rotatif. Il s'agit préférentiellement d'un disque rotatif qui peut être confiné dans une enceinte close, en particulier en acier inoxydable.

Le disque rotatif est relié à un moteur à vitesse variable permettant de régler la vitesse de rotation du disque de manière appropriée et de définir ainsi le temps de séjour du produit atomisé sur l'organe de séchage avant tout traitement ultérieur.

Selon un second aspect, l'organe de séchage (11) est un tapis roulant, de préférence un tapis roulant perforé du type « Filtermat » commercialisé par la Société Niro Atomizer ou encore du type « Jet Belt Dryer » commercialisé par la Société Technic Process, ou tout autre moyen de caractéristiques équivalentes.

Par tout autre moyen de caractéristiques équivalentes, on entend au sens de la présente invention, un organe capable de recueillir le produit atomisé en aval de la tour d'atomisation (7) et de maintenir le produit atomisé au contact du gaz chaud circulant en aval de la tour d'atomisation afin de compléter la déshydratation du produit atomisé jusqu'à un taux maximal d'humidité choisi, avant tout traitement ultérieur de la poudre déshydratée résultante.

Selon une caractéristique complémentaire, le dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables selon l'invention comprend, en aval de l'organe de séchage (11), un moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche.

De manière préférée, le moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche est un vibro-fluidiseur, bien connu de l'homme du métier.

Préférentiellement, le vibro-fluidiseur est pourvu d'un moyen (14) de chauffage, ainsi que d'un ventilateur (13).

Un moyen de transport (18) de la poudre sèche peut être disposé entre l'organe de séchage (11) et le moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche.

5 Un broyeur (23) peut être disposé en aval du moyen de fluidisation (15).

Le dispositif selon l'invention peut également comprendre un ensemble de moyens destinés à assurer l'atomisation du milieu liquide contenant les micro-organismes viables. Le dispositif est donc en outre caractérisé en ce que la tour d'atomisation (7) comprend:

10 • un moyen (6) d'arrivée de gaz chaud sous pression situé au sommet de la tour d'atomisation (7);

15 • un moyen (2) d'arrivée sous pression d'un milieu liquide contenant les micro-organismes viables et débouchant sur une buse (3) située au sommet de la tour d'atomisation (7).

Le courant de gaz chaud est créé grâce à un moyen (4), qui peut être un ventilateur d'air.

20 La tour d'atomisation (7) comprend en outre un moyen (19) d'évacuation du gaz chaud chargé en particules de produit atomisé partiellement déshydraté, situé au sommet de la tour d'atomisation.

Selon un mode particulier de réalisation du dispositif selon l'invention, le moyen (19) d'évacuation du gaz chaud chargé en particules de produit atomisé partiellement déshydraté est relié à un moyen de recyclage desdites particules comportant une canalisation (16) arrivant au sommet de la tour d'atomisation (7).

Selon une alternative, la canalisation (16), ou encore une dérivation de celle-ci, peut aboutir sur l'organe de séchage (11), cette alternative n'étant pas représentée sur la figure unique.

30 Un surpresseur (12) assure la circulation des particules de poudre recyclées jusqu'au sommet de la tour d'atomisation (7).

Le moyen de recyclage des particules de produit atomisé partiellement déshydraté peut comprendre en outre un dispositif à effet cyclone (8) au sommet duquel débouche le moyen (19) d'évacuation du gaz chaud chargé en particules et reliée à sa base à la canalisation (16).

35

Un tel dispositif à effet cyclone permet, par différence de densité, de séparer les particules de poudre partiellement déshydratées qui descendent par gravitation à la base du dispositif à effet cyclone (8) et qui peuvent être recyclées vers la tour d'atomisation (7) par la canalisation (16),
5 lorsque la vanne (17) est ouverte.

Le dispositif à effet cyclone (8) peut comporter à son sommet un moyen d'aspiration (20).

En outre, une canalisation (24) dans laquelle circule le gaz chaud venant du moyen de fluidisation (15) débouche sur le moyen d'aspiration
10 (20).

Le moyen d'aspiration (20) peut être une canalisation reliée au sommet d'un second dispositif à effet cyclone (9), lui-même relié par sa base à la canalisation (16) par laquelle les particules de produit atomisé partiellement déshydraté pourront être recyclées par réintroduction au
15 sommet de la tour d'atomisation (7). Une vanne (21) est placée à la base du dispositif à effet cyclone (9).

En aval du dispositif à effet cyclone (9) un ventilateur (10) aspire le gaz de sortie et crée ainsi une dépression d'air.

Selon un aspect particulier du dispositif selon l'invention, le moyen
20 (2) d'arrivée sous pression du milieu liquide contenant les micro-organismes viables comporte une pompe d'alimentation (1).

Un moyen de chauffage (22) du milieu liquide contenant les micro-organismes peut être placé en amont de la pompe d'alimentation (1).

Selon un autre aspect particulier du dispositif selon l'invention, le
25 moyen (2) d'arrivée sous pression du milieu liquide contenant les micro-organismes viables comporte également un moyen de régulation thermique (22).

L'invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples ci-après.

30

EXEMPLES:

Les exemples de mise en oeuvre d'un procédé conforme à l'invention ont tous été réalisés sur un dispositif comprenant une tour
35 d'atomisation en trois temps de la marque NIROATOMIZER MSD, de

capacité évaporatoire de 50 à 70 kg d'eau par heure, équipée selon l'invention d'un organe de séchage constitué d'un disque rotatif de cristallisation Niro Kestner.

5 **EXEMPLE 1: Déshydratation par atomisation et séchage de bactéries propioniques.(1ère réalisation).**

1.1 Préparation du milieu liquide contenant les micro-organismes.

10

300 litres de *Propionibacterium acidipropionici* (souche ATCC 4965) en suspension, concentrés à $5,4 \times 10^{10}$ UFC/ml par ultrafiltration à l'aide de pompes positives et de membranes minérales, M1 (70 000 Da et commercialisées par la Société Tech-Sep, France, surface : $6,8 \text{ m}^2$) ont été
15 utilisés pour chacune des expérimentations.

Le concentré bactérien était mélangé à un concentré à 50% de matière sèche de lactosérum doux, obtenu à partir de poudre de lactosérum de fromages à pâte pressée cuite (lot homogène, qualité humaine, Entremont) puis mis en solution dans de l'eau préalablement filtrée sur une
20 membrane de taille de pores de $0,2 \mu\text{m}$, puis chauffé à 70°C pour faciliter sa dissolution et ensuite refroidi à 20°C .

La concentration cellulaire du mélange était $5,5 \cdot 10^9$ UFC/ml et le pH de la suspension était de $5,7 \pm 0,1$. L'extrait sec était de 322 g/kg . (La densité cellulaire était donc de $1,7 \cdot 10^{10}$ UFC/g de matière sèche).

25

1.2 Atomisation et séchage

Les paramètres de séchage suivants ont été appliqués: température air entrée 120°C , température air sortie 40°C , pression
30 d'alimentation de la buse 10 MPa , vitesse de rotation du disque du finisseur $0,2 \text{ tour/min}$. La buse utilisée avait un diamètre de $0,73 \text{ mm}$, le pointeau était le n°421 permettant un angle de pulvérisation de 60° .

Les poudres obtenues ont été stockées dans des sacs d'aluminium à 7 et 17°C pendant 6 mois.

35

1.3. Viabilité des micro-organismes.

Aussitôt après la fabrication, $1,7 \times 10^{10}$ UFC/g ont été dénombrés dans la poudre, ce qui indique une viabilité de 100%. L'humidité de la poudre
5 était de 6,8%. La poudre présentait une solubilité supérieure à 99,5%. La dispersibilité de cette poudre était de 98,5%. L'indice de mouillabilité était de 6 secondes. La taille des particules était comprise entre 40 μ m et 1 mm.

Les méthodes de mesure de l'humidité, de la dispersibilité, de l'indice de mouillabilité et de la taille de particules étaient celles décrites
10 dans le manuel NIRO ATOMIZER 4ème éd. 1978. La mesure de solubilité était celle préconisée par l'ADPI (1990) Bulletin 916.

Après 6 mois de conservation à 7°C, une viabilité de 82% était dénombrée dans la poudre.

La flore mésophile aérobie revivifiable FMAR était déterminée sur
15 PCA (Difco) selon la méthode connue de l'homme du métier.

Les propionibactéries étaient déterminées comme décrit dans le brevet français 93 00 823 après reconstitution des poudres comme suit : 10g de poudre étaient ajoutés à une solution stérile composée de 90 ml d'eau distillée, 1g de peptone (Difco, USA) et 0,765g de NaCl. Le pH était ajusté à
20 7,0 . Le mélange était maintenu à 37°C-30 min. et homogénéisé 3 min dans un équipement STOMACHER (Labo Blender, U.K.).

EXEMPLE 2: Déshydratation par atomisation et séchage de bactéries propioniques.(2ème réalisation).

25 Le concentré bactérien a été préparé conformément à l'enseignement de l'exemple 1 ci-dessus.

Le concentré bactérien initial présentait une viabilité de $2,9 \times 10^{10}$ UFC/g . La concentration cellulaire du mélange avec le lactosérum était de
30 3.10^9 UFC/ml, mais la teneur en matière sèche dudit mélange a été accrue à 461 ± 2 g/kg.

2.1 Atomisation et séchage.

Les paramètres de séchage suivants ont été appliqués: température air entrée 115°C, température air sortie 50°C. Pression d'alimentation de la buse 17MPa, vitesse de rotation du disque du finisseur 0,2 tour/min. Tous les autres paramètres étaient identiques à ceux de l'exemple 1.

2.2 Viabilité des micro-organismes

La poudre finale obtenue à la fabrication présentait une population de 9.4×10^8 UFC/g. L'humidité de la poudre était de 4% en raison de l'augmentation de la température de sortie de l'air.

La poudre présentait une solubilité supérieure à 99,5%. La dispersibilité de cette poudre était 95%. L'indice de mouillabilité était de 10 secondes. La taille des particules était comprise entre 40µm et 1 mm. Le pourcentage de viabilité était de 14%.

Après 6 mois de conservation à 7°C, une population de 7.10^8 UFC/g était dénombrée, ce qui représente une viabilité de 74%.

EXEMPLE 3: Séchage par atomisation de bactéries lactiques (1ère réalisation).

3.1 Préparation du milieu liquide contenant les bactéries lactiques.

Une souche industrielle de *Lactobacillus plantarum* a été étudiée. La multiplication des cellules fut réalisée selon les procédures classiques de production de levains industriels. Cette souche présente une mortalité importante (> 90%) lors de sa dessiccation par lyophilisation. La suspension cellulaire (570 kg \pm 10 kg) concentrée par centrifugation était placée en containers en plastique de 60 kg environ, sans neutralisation préalable.

3.2. Atomisation et séchage.

Le concentré bactérien était mélangé avec un concentré à 50% de matière sèche de lactosérum doux. Les paramètres de séchage suivants ont

été appliqués: température air entrée 140°C, température air sortie 58°C, pression de la buse d'alimentation 12MPa, vitesse de rotation du disque du finisseur 0,2 tour/min.

La buse utilisée avait un diamètre de 0,78 mm, le pointeau était le n°421 permettant un angle de pulvérisation de 62°. Tous les autres paramètres étaient identiques aux exemples précédents.

La poudre était ensuite stockée à 7°C dans des sacs d'aluminium pour un suivi de la viabilité pendant 9 mois.

Le concentré bactérien présentait une densité cellulaire de $1,7 \times 10^{11}$ UFC/g à $1,5 \times 10^{11}$ UFC/g. Le pH de la suspension était de $5,85 \pm 0,02$ au cours des essais. La teneur en matière sèche était de 360 g/kg.

Une poudre contenant $1,3 \times 10^{10}$ cellules revivifiables par gramme de matière sèche était obtenue. La poudre présentait une solubilité supérieure à 99,5%. L'indice de mouillabilité était inférieur à 5 secondes. Ces résultats s'expliquent par la présence d'une part de particules à haute densité et d'autre part, par la présence de lactosérum qui favorise la mouillabilité des poudres.

3.3 Viabilité des bactéries lactiques

Après 3 mois de conservation à 7°C, la viabilité était maintenue mais la densité cellulaire chutait à 14% de la densité cellulaire de la poudre initiale après 9 mois de conservation à 7°C.

EXEMPLE 4: Séchage par atomisation de bactéries lactiques (2ème réalisation).

La préparation du milieu liquide contenant les bactéries lactiques est réalisée conformément à l'enseignement de l'exemple 3.

4.1 Atomisation et séchage.

Réincorporation de la poudre de lactosérum dans le concentré bactérien.

Les paramètres de séchage suivants ont été appliqués : température air entrée 125°C, température air sortie 58°C, pression de la buse d'alimentation 12MPa, vitesse de rotation du disque du finisseur 0,2 tour/min.

5 La buse utilisée avait un diamètre de 0,78 mm, le pointeau était le n°421 permettant un angle de pulvérisation de 62°. Tous les autres paramètres sont demeurés identiques aux exemples précédents.

Extrait sec du mélange: 474 ± 2 g/kg.

10 La poudre est ensuite stockée à 7°C dans des sacs d'aluminium pour un suivi de la viabilité pendant 9 mois.

Cet essai donnait les meilleurs résultats avec $2,9 \times 10^{10}$ cellules revivifiables par gramme de matière sèche. La réincorporation de la poudre de lactosérum directement dans le concentré permettait d'atteindre une haute teneur en matière sèche dans le produit avant séchage (470 g/kg).
15 L'augmentation de cette teneur améliorerait le séchage, la température d'air d'entrée pouvait être abaissée de 140 à 125°C. Cette diminution était favorable au maintien de la viabilité des micro-organismes. De plus, l'apport d'eau à sécher sur la tour était limité (120 kg d'eau) ce qui conduit à une économique d'énergie.

20 L'humidité de la poudre se situait à 4%. La poudre présentait une solubilité supérieure à 99,5%. L'indice de mouillabilité était inférieur à 5 secondes. Ces résultats s'expliquent par la présence d'une part de particules à haute densité et d'autre part, par la présence de lactosérum qui favorise la mouillabilité des poudres.

25

4.2 Viabilité des bactéries lactiques.

L'examen microbiologique des poudres montrait une absence de Clostridium sulfito-réducteurs et une flore Coliforme inférieure à 10 germes
30 par gramme.

La conservation de ces poudres microbiennes montrait un maintien total de la viabilité après 3 mois à 7°C et une conservation de 66% par rapport à la viabilité de la poudre initiale pour la poudre après 9 mois.

Les bactéries lactiques étaient dénombrées sur milieu M.R.S. gélosé après 24 h à 30°C (de Man et al., 1960) sur l'échantillon de poudre reconstituée comme décrit précédemment.

Les Clostridium sulfito réducteurs étaient dénombrés sur milieu VF
5 et les coliformes sur milieu URBL selon les procédures connues de l'homme du métier.

EXEMPLE 5: Séchage par atomisation de bifidobactéries: préparation d'un aliment lacté séché.

10

5.1. Souche de micro-organisme.

La déshydratation d'une formulation contenant une souche de *Bifidobacterium* a été étudiée. Cette souche est commercialisée par la
15 Société Chr. Hansen, n° du lot DN 156007/92618 (DLUO: 12.07.00) et était conservée 3 semaines à -20°C.

5.2. Atomisation et séchage.

148,5 kg de concentré bactérien étaient mélangés avec 250 kg de concentré de lactosérum doux à 58% de matière sèche. Les paramètres de séchage mis en oeuvre étaient : température air entrée 135°C, température air sortie 61°C, pression de la buse d'alimentation 15 MPa, vitesse de rotation du disque du fournisseur 0,2 tour/min. La buse utilisée avait un
25 diamètre de 0,78 mm, le pointeau était le n°421 permettant un angle de pulvérisation de 62°. Tous les autres paramètres étaient identiques aux exemples précédents.

La densité cellulaire du mélange se situait entre 2×10^9 UFC/g et $3,1 \times 10^9$ UFC/g. Le pH du mix était de $5,73 \pm 0,02$. Sa teneur en matière sèche était de 396 g/kg.
30

La poudre obtenue, contenant une densité cellulaire élevée de bifidobactéries, présentait une solubilité supérieure à 99,5%. L'indice de mouillabilité était inférieur à 5 secondes.

Revendications

1. Procédé pour l'obtention d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue, par atomisation d'un milieu liquide contenant les micro-organismes, caractérisé en ce que l'étape d'atomisation est réalisée dans des conditions permettant d'obtenir un produit atomisé dont le taux d'humidité est compris entre 5% et 15%, préférentiellement entre 7% et 10% environ, et est suivie d'une étape de séchage du produit atomisé.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'atomisation du milieu liquide contenant les micro-organismes viables est réalisée à co-courant dans un gaz chaud.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le milieu liquide et le gaz chaud sont introduits au sommet d'une tour d'atomisation.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la température du gaz à l'entrée de la tour d'atomisation est comprise entre 100°C et 180°C, préférentiellement entre 120°C et 140°C.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la température du gaz à la sortie de la tour d'atomisation est comprise entre 30°C et 85°C, préférentiellement entre 40°C et 60°C.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le débit de gaz à l'entrée de la tour d'atomisation est compris entre 3500 et 6000 m³/h.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la pression d'entrée du milieu liquide contenant les micro-organismes au sommet de la tour d'atomisation est comprise entre 8 et 18 MPa, de préférence entre 10 et 12 MPa.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape de séchage du produit atomisé est réalisée avec ou sans chauffage, à l'aide d'un organe de séchage tel qu'un disque rotatif ou un tapis roulant.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la durée de l'étape de séchage du produit atomisé est comprise entre 5 et 30 minutes, préférentiellement entre 10 et 20 minutes.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce
5 que le milieu liquide contenant les micro-organismes viables comprend entre 15% et 30% d'un sucre cristallisable, en poids total du milieu liquide.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape de séchage du produit atomisé est accompagné d'une cristallisation du sucre contenu dans ce dernier.

10 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la poudre sèche obtenue à l'issue de l'étape de séchage possède un taux d'humidité compris entre 3% et 7% , tel que mesuré par dessiccation à l'étuve jusqu'à masse constante.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en
15 ce que la poudre atomisée et séchée est ensuite fluidisée.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la poudre fluidisée subit une étape de broyage.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les micro-organismes sont des bactéries, préférentiellement des
20 bactéries lactiques, des *Propionibactéries*.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le milieu liquide comprend entre environ 10^7 et 10^{12} micro-organismes viables par millilitre.

17. Poudre sèche contenant de 10^7 à 10^{12} micro-organismes
25 viables par gramme de matière sèche.

18. Poudre sèche obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisée en ce qu'elle contient de 10^4 à 10^{12} micro-organismes viables à propriétés probiotiques par gramme de matière sèche.

19. Poudre sèche selon l'une des revendications 17 et 18
30 comprenant de 60% à 70% de sucre sous forme cristallisée.

20. Poudre sèche selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisée en ce qu'elle possède un taux d'humidité compris entre 3% et 7%, tel que mesuré par dessiccation à l'étuve jusqu'à masse constante.

21. Poudre sèche selon l'une des revendications 17 à 20,
35 caractérisée en ce que le nombre de micro-organismes viables après une

conservation à l'abri de l'air pendant 6 mois à une température comprise entre 7 et 17°C est d'au moins 70%, préférentiellement 80% du nombre de micro-organismes dans la poudre sèche initiale.

22. Composition destinée à l'ensemencement d'un produit en vue
5 de la multiplication de micro-organismes, caractérisée en ce qu'elle comprend un poudre sèche selon l'une des revendications 17 à 21.

23. Produit pour l'alimentation humaine ou animale, caractérisé en ce qu'il estensemencé avec une poudre selon l'une des revendications 17 à 21 ou avec une composition selon la revendication 22.

10 24. Produit pour l'alimentation humaine ou animale, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une poudre sèche selon l'une des revendications 17 à 21.

25. Produit selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il est un lait fermenté, un levain ou une boisson fermentée.

15 26. Dispositif pour la fabrication par atomisation d'une poudre contenant des micro-organismes viables et à durée de conservation longue, comprenant une tour d'atomisation (7), caractérisé en ce que ledit dispositif comprend un organe de séchage (11) placé en aval de la tour d'atomisation.

20 27. Dispositif selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'organe de séchage (11) est disposé à la base de la tour d'atomisation.

28. Dispositif selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que l'organe de séchage est dépourvu de moyen de chauffage.

29. Dispositif selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que l'organe de séchage comporte un moyen de chauffage.

25 30. Dispositif selon l'une des revendications 26 à 29, caractérisé en ce que l'organe de séchage (11) est constitué d'un disque rotatif.

31. Dispositif selon l'une des revendications 26 à 30, caractérisé en ce que l'organe de séchage (11) est un tapis roulant.

30 32. Dispositif selon l'une des revendications 26 à 31, caractérisé en ce qu'il comprend, en aval de l'organe de séchage (11), un moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche.

33. Dispositif selon la revendication 32, caractérisé en ce que le moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche est un vibro-fluidiseur.

35 34. Dispositif selon la revendication 33, caractérisé en ce que le vibro-fluidiseur est pourvu d'un moyen (14) de chauffage.

35. Dispositif selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisé en ce qu'un moyen de transport (18) de la poudre sèche est disposé entre l'organe de séchage (11) et le moyen (15) de fluidisation de la poudre sèche.

36. Dispositif selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisé en ce qu'un broyeur (23) est disposé en aval du moyen de fluidisation (15).

37. Dispositif selon l'une des revendications 26 à 36, caractérisé en ce que la tour d'atomisation (7) comprend :

- un moyen (6) d'arrivée de gaz chaud sous pression situé au sommet de la tour d'atomisation (7) ;

- un moyen (2) d'arrivée sous pression d'un produit liquide contenant les micro-organismes viables et débouchant sur une buse (3) située au sommet de la tour d'atomisation (7) ;

38. Dispositif selon la revendication 37, caractérisé en ce que la tour d'atomisation (7) comprend en outre un moyen (19) d'évacuation de l'air chaud chargé en particules de produit atomisé, situé au sommet de la tour d'atomisation (7).

39. Dispositif selon la revendication 38, caractérisé en ce que le moyen (19) d'évacuation du gaz chaud chargé en particules de produit atomisé est relié à un moyen de recyclage desdites particules, comportant une canalisation (16) arrivant au sommet de la tour d'atomisation (7) ou sur l'organe de séchage (11).

40. Dispositif selon la revendication 39, caractérisé en ce que le moyen de recyclage des particules de produit atomisé comprend en outre un dispositif à effet cyclone (8) au sommet duquel débouche le moyen (19) d'évacuation du gaz chaud chargé en particules de produit atomisé et relié à sa base à la canalisation (16).

41. Dispositif selon la revendication 40, caractérisé en ce que le dispositif à effet cyclone (8) comporte à son sommet un moyen d'aspiration (20).

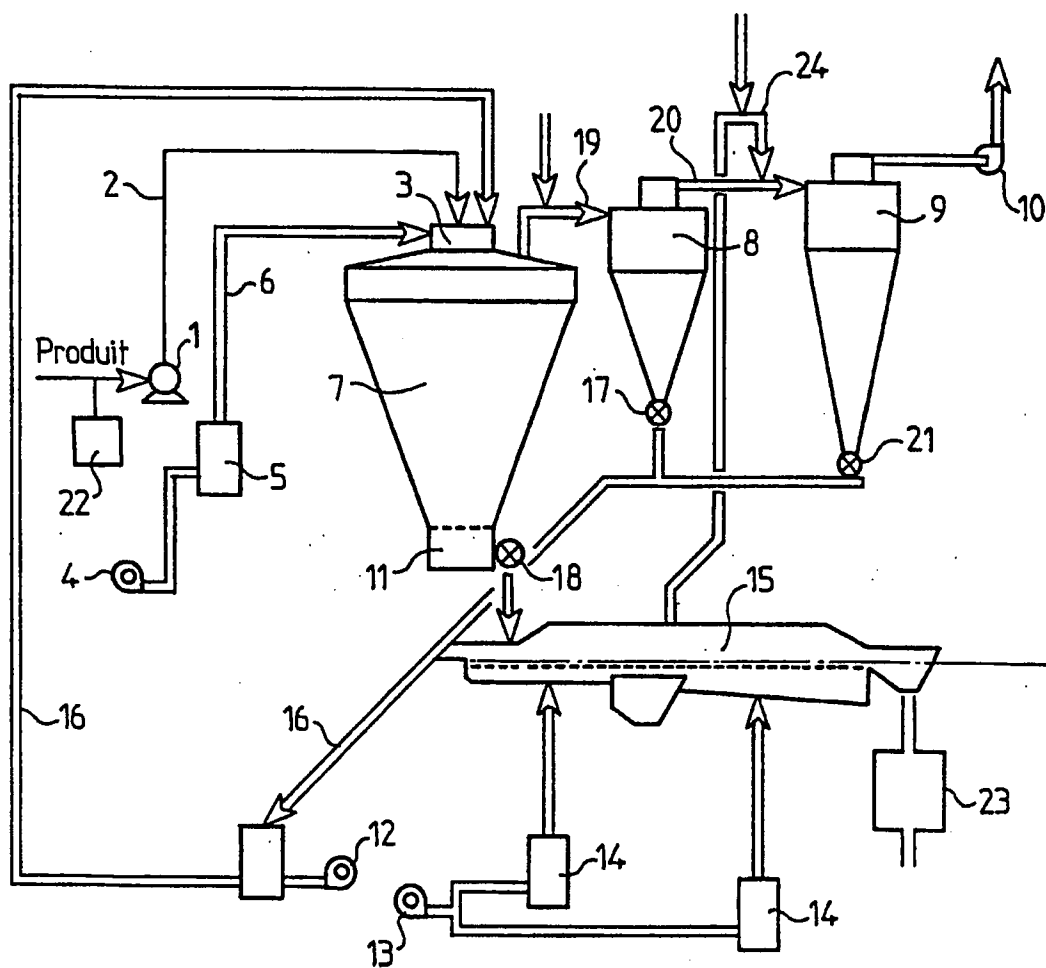
42. Dispositif selon la revendication 41, caractérisé en ce que le moyen d'aspiration (20) est une canalisation reliant le moyen de fluidisation (15) au sommet d'un second dispositif à effet cyclone (9), lui-même relié par sa base à la canalisation (16).

43. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 37 à 42, caractérisé en ce que le moyen (2) d'arrivée sous pression du milieu liquide

contenant les micro-organismes viables comporte une pompe d'alimentation (1).

44. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 37 à 43, caractérisé en ce que le moyen (2) d'arrivée sous pression du milieu liquide
- 5 contenant les micro-organismes viables comporte un moyen de régulation thermique (21).

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03492

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 290 846 A (INST BIOLOG APLICADA SA) 11 June 1976 (1976-06-11) page 7, line 16 -page 12; claims ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14 January 1998 (1998-01-14) claims; table 1 ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	EP 0 906 951 A (INHALE THERAPEUTIC SYST) 7 April 1999 (1999-04-07) page 6, paragraph 6; claims; example 8 --- -/--	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2001

Date of mailing of the international search report

23/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 00/03492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 10666 A (NESTLE SA ;MEISTER NIKLAUS (CH); SUTTER ANDREAS (CH); VIKAS MARTIN) 19 March 1998 (1998-03-19) claims ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	US 4 423 079 A (KLINE LEO) 27 December 1983 (1983-12-27) claims ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 1987-319054 XP002145298 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28 February 1987 (1987-02-28) abstract ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198648 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 1986-318102 XP002145299 & SU 1 227 145 A (AS UKR HEAT PHYS), 30 April 1986 (1986-04-30) abstract -----	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03492

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2290846	A	11-06-1976	NONE	
EP 0818529	A	14-01-1998	AU 728199 B	04-01-2001
			AU 2851597 A	15-01-1998
			BR 9703941 A	01-09-1998
			CA 2208727 A	09-01-1998
			CN 1173974 A	25-02-1998
			JP 10057031 A	03-03-1998
			NZ 328264 A	29-06-1999
			US 6010725 A	04-01-2000
			ZA 9705040 A	07-12-1998
EP 0906951	A	07-04-1999	AU 659645 B	25-05-1995
			AU 1848692 A	07-01-1993
			CA 2072420 A	27-12-1992
			EP 0520748 A	30-12-1992
			JP 5293354 A	09-11-1993
			US 5928469 A	27-07-1999
WO 9810666	A	19-03-1998	AU 4701597 A	02-04-1998
			BR 9712025 A	31-08-1999
			EP 0924993 A	30-06-1999
			HU 9904266 A	28-04-2000
			NO 991135 A	09-03-1999
			TW 387798 B	21-04-2000
			ZA 9708025 A	05-03-1999
US 4423079	A	27-12-1983	CA 1158475 A	13-12-1983
SU 1292706	A	28-02-1987	NONE	
SU 1227145	A	30-04-1986	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. .de Internationale No

PCT/FR 00/03492

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N1/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 290 846 A (INST BIOLOG APLICADA SA) 11 juin 1976 (1976-06-11) page 7, ligne 16 -page 12; revendications ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14 janvier 1998 (1998-01-14) revendications; tableau 1 ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	EP 0 906 951 A (INHALE THERAPEUTIC SYST) 7 avril 1999 (1999-04-07) page 6, alinéa 6; revendications; exemple 8 --- -/--	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 avril 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/04/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. .de internationale No

PCT/FR 00/03492

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 98 10666 A (NESTLE SA ;MEISTER NIKLAUS (CH); SUTTER ANDREAS (CH); VIKAS MARTIN) 19 mars 1998 (1998-03-19) revendications ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
Y	US 4 423 079 A (KLINE LEO) 27 décembre 1983 (1983-12-27) revendications ---	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 1987-319054 XP002145298 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28 février 1987 (1987-02-28) abrégé ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198648 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 1986-318102 XP002145299 & SU 1 227 145 A (AS UKR HEAT PHYS), 30 avril 1986 (1986-04-30) abrégé -----	1,3-5, 10,13, 15,20, 23,25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De, .de Internationale No

PCT/FR 00/03492

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2290846	A	11-06-1976	AUCUN	
EP 0818529	A	14-01-1998	AU 728199 B	04-01-2001
			AU 2851597 A	15-01-1998
			BR 9703941 A	01-09-1998
			CA 2208727 A	09-01-1998
			CN 1173974 A	25-02-1998
			JP 10057031 A	03-03-1998
			NZ 328264 A	29-06-1999
			US 6010725 A	04-01-2000
			ZA 9705040 A	07-12-1998
EP 0906951	A	07-04-1999	AU 659645 B	25-05-1995
			AU 1848692 A	07-01-1993
			CA 2072420 A	27-12-1992
			EP 0520748 A	30-12-1992
			JP 5293354 A	09-11-1993
			US 5928469 A	27-07-1999
WO 9810666	A	19-03-1998	AU 4701597 A	02-04-1998
			BR 9712025 A	31-08-1999
			EP 0924993 A	30-06-1999
			HU 9904266 A	28-04-2000
			NO 991135 A	09-03-1999
			TW 387798 B	21-04-2000
			ZA 9708025 A	05-03-1999
US 4423079	A	27-12-1983	CA 1158475 A	13-12-1983
SU 1292706	A	28-02-1987	AUCUN	
SU 1227145	A	30-04-1986	AUCUN	